DOI:10.11931/guihaia.gxzw202407017

基于 SLAF-Seq 的广西八角种质资源遗传多样性分析

李金梅[1,2]，钟 雨[1]，陈建桦[1,2]，明如宏[1,2]，姚绍嫦[1,2]，李良波[1,2]，
谭 勇[1,2]，黄荣韶[1,2]，姚 春[1]，黄 鼎[1,2*]
（1. 广西中医药大学 药学院，南宁 530200；2. 广西中医药大学 广西壮瑶药重点实验室，南宁 530200）

摘 要：八角作为广西重要的特色经济林木之一，遗传变异丰富。为揭示广西八角种质资源遗传多样性，该研究运用 SLAF-Seq 技术，对源自广西不同地理区域的 53 份八角居群样本及 42 份人工筛选的优良种质样本的单核苷酸多态性（SNP）位点进行了深入挖掘；基于 SNP 多态性，对这些八角样本进行了群体遗传结构和遗传多样性分析。结果表明：（1）从 95 份八角样本中，共获得 1 588 Mb 测序数据和 643 690 个 SLAF 标签，其中包含 74 434 个多态性 SLAF 标签，经过滤后得到 2 690 564 个群体 SNP。（2）95 份八角样本可分为两个主要类群，其中桂北、桂西及部分桂中部地区居群样本聚为一个类群；42 份人工筛选优良种质与桂南、桂东以及部分桂中地区的居群样本聚为另一类群。（3）桂北地区居群的遗传多样性最高，其次依次为桂东、桂中、桂西和桂南地区居群样本，而人工筛选的八角优良种质的遗传多样性最低。综上，该研究基于 SLAF-Seq 开发的 SNP 分子标记能够有效分析广西不同地区居群样本以及人工筛选的优良种质的遗传多样性，对广西八角的种质资源保护与利用以及优良种质筛选提供了重要的理论参考依据。

关键词：八角，SLAF-Seq，SNP，遗传结构，遗传多样性
中图分类号：Q949.9　　　　**文献标识码**：A

Genetic diversity analysis of *Illicium verum* germplasm resources in Guangxi using SLAF-Seq

LI Jinmei[1,2], ZHONG Yu[1], CHEN Jianhua[1,2], MING Ruhong[1,2], YAO Shaochang[1,2], LI Liangbo[1,2], TAN Yong[1,2], HUANG Rongshao[1,2], YAO Chun[1], HUANG Ding[1,2*]
(1. *College of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China; 2. *Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, Nanning 530200, China)

Abstract: As one of the significant characteristic economic forestry species in Guangxi, star anise (*Illicium verum* Hook. f.) showcases a rich genetic variation. In order to uncover the genetic diversity of star anise germplasm resources in Guangxi, the specific amplified fragment sequencing (SLAF-Seq) technology was employed. This enabled an in-depth investigation into the single nucleotide polymorphism (SNP) loci across 53 star anise population samples, gathered from a variety of geographical territories within Guangxi, as well as 42 samples of artificially selected superior germplasm. Based on SNP polymorphism, population genetic structure and genetic diversity analyses were conducted on these star anise samples. The results were as follows: (1) From 95 star anise samples, a total of 1 588 Mb of sequencing data and 643 690 SLAF tags were obtained, of which 74 434 were polymorphic SLAF tags. After filtering, 2 690 564 population

基金项目：广西科技重大专项项目（桂科 AA22096029，桂科 AA23023035）；广西自然科学基金青年基金项目（2024GXNSFBA010089）；广西中医药大学-柳药集团青年科技创新能力提升计划专项项目（GL-2023-01）。
第一作者：李金梅（1998—），硕士研究生，研究方向为中药资源学，（E-mail）2281953548@qq.com。
[*]**通信作者**：黄 鼎，博士，副研究员，研究方向为中药资源开发与利用，（E-mail）hdh016@126.com。

SNPs were identified. (2) The 95 star anise samples were classified into two fundamental clades: one clade assimilated samples originating from the northern, western, and some regions of central Guangxi, whereas the other clade embraced the 42 samples of artificially selected superior germplasm, coupled with samples from southern, eastern, and portions of central Guangxi. (3) Populations from northern Guangxi exhibited the highest level of genetic diversity, followed sequentially by those from eastern, central, western, and southern Guangxi. In contrast, the artificially selected superior germplasm samples displayed the lowest degree of genetic diversity. The study effectively demonstrates that SNP molecular markers, derived from SLAF-Seq technology, are capable of efficiently assessing the genetic diversity in samples from different Guangxi regions and the samples of artificially selected superior germplasm. This information acts as a significant theoretical guide for the conservation, utilization of the star anise genetic resources in Guangxi, as well as the selection of superior germplasms.
Key words: *Illicium verum*, SLAF-Seq, SNP, genetic structure, genetic diversity

八角（*Illicium verum* Hook.f.），又称为大茴香或八角茴香，隶属于八角科八角属（*Illicium*）。从系统发育学的角度来看，八角被划分为被子植物门中的一个古老分支，揭示了它与木兰目植物的密切亲缘关系，其代表了被子植物早期演化的一部分。（中国科学院中国植物志编辑委员会，2004；Chen et al., 2019）。八角科植物的特征包括具有芳香的气味和独特的果实结构，突显了其在植物分类中的特殊地位（孙雪阳等，2011；曾丽萍等，2014）。八角不仅是一种重要的香料和药材资源，在经济和药用方面也有着不可忽视的价值（Wang et al., 2011）。八角的干燥成熟果实富含高浓度的芳香油，是食品工业中极为重要的香料成分。八角芳香油具有独特的甜香和辛辣风味，因此在烘烤食品、酒类、饮料、糖果等食品领域中得到了广泛的应用（He et al., 2024）。在中医领域，八角因其温阳散寒、理气止痛的特性，被广泛用于治疗寒疝腹痛、腰膝冷痛等病症（国家药典委员会，2020）。广西是我国最大的八角原产地和主产区，种植面积和产量占比均超过全国总量的 85%（Liao et al., 2023），2023 年八角种植产业年产值达 40 亿元，作为“桂十味”药材之一，其发展前景备受期待（Zou et al., 2023）。

八角的种质资源评价及优良品系筛选是提升其经济和药用价值的关键环节。在广西，得益于政府的政策支持，种植者们通过嫁接换冠技术对低产八角林进行改良，以提高其生产力。目前，八角的研究主要集中在其生物学特性、活性成分和药理作用等方面。例如，陆华业等（2024）研究探究光氮互作对八角幼苗生长和生理特性的影响，发现光照强度对八角幼苗的生长至关重要。此外，已有研究对八角的化学成分和药理学研究进展进行了详细综述，表明八角的生物活性取决于是否存在有价值的次生代谢物，如单萜类、倍半萜类、苯丙烷类和黄酮类等（Patra et al., 2020; Sharafan et al., 2022）。同时，Li 等（2022）通过鉴定八角果实中的 20 种化合物，并评估它们的抗病毒和抗氧化活性，为开发新的天然产物提供了科学基础。但目前对八角的分子遗传学研究相对较少，直接影响了八角优良种质的筛选进程，这在一定程度上阻碍了八角产业的科学化发展。以往的研究主要依赖于八角的花色、叶形和果实外部形态等特征来划分种质资源类型，而缺乏遗传学的证据支持（孙雪阳等，2011；戴晓萧和江立庚，2019）。广西不同地区八角种质资源的遗传背景尚未得到系统性的研究，各地居群及人工筛选的优良种质间的遗传变异和群体结构问题也未被充分阐明。

SLAF-Seq（Specific Length Amplified Fragment sequencing）技术是一种结合了限制性酶切和 PCR 扩增步骤的高通量测序方法，主要用于基因组水平上的单核苷酸多态性（SNP）鉴定和遗传变异分析（赵亚琴等，2021）。该技术能够高效识别植物种质资源中的遗传变异位点，深入揭示其遗传机制、进化历史和种质关系，为优良种质选育提供理论依据，从而显著缩短新品种选育的周期。因其高效、经济且适用于大规模研究的特点，SLAF-Seq 技术在

植物遗传学、作物改良和种质资源保护等领域展现出广泛的应用前景（崔学强等，2023）。以菘蓝为例，刘东等（2024）利用 SLAF-Seq 技术结合叶片表观特征分析，成功区分了 25 个不同生态类型的菘蓝，揭示了这些生态类型之间的遗传关系。此外，沈涛等（2023）通过 SLAF-Seq 技术研究了分布于不同地区的 19 个滇龙胆居群样本的遗传结构和遗传多样性，认为环境隔离是导致滇龙胆种群分化的主要因素之一。这些研究表明，SLAF-Seq 技术在传统药用植物种质资源的多样性研究中发挥着重要作用。然而，该技术尚未在八角种质资源的遗传多样性分析研究中得到应用。

针对广西八角种质资源遗传背景缺乏系统性研究这一瓶颈问题，有学者利用第二代分子标记和 DNA 条形码对八角的遗传多样性进行了初步分析。余兴华等（2022）利用 SSR 分子标记技术对 8 种不同花色的八角种质进行了分析；王乙淋等（2023）基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对广西的 13 个八角居群展开了八角谱系地理学研究。但是，由于前人的研究中收集到的八角种质资源数量有限，并且第二代标记的标记密度和通量低等技术缺点，对广西八角遗传多样性的研究还不够深入和系统。本研究收集了来自广西多个地区居群以及经过人工筛选的八角样本共计 95 份，运用 SLAF-Seq 技术，成功获取了丰富的 SNP 标记数据。借助这些分子标记，对八角样本进行了深入的系统发育分析、群体结构解析以及遗传关系的探讨。此项工作不但揭示了广西不同地区八角居群与人工筛选优良种质间的遗传多样性和亲缘关系，而且为广西八角种质资源的评估和新品种选育工作提供了良好的理论基础和科学依据。因此，本研究对于八角品种的科学分类、规范命名、种质资源的准确评价以及优良品种的选育具有极其重要的理论指导价值。

1　材料与方法

1.1 实验材料

对广西八角主要分布区域的八角材料进行采集，共收集到 95 份八角材料。这些材料中共有 53 份来自不同地区的居群样本（表 1），包含桂南(GS)地区居群样本 17 份，其中 7 份来自钦州浦北(PB)，10 份来自防城港(FCG)；桂中部(GM)地区居群样本 8 份，均来自南宁上林(SL)；桂西(GW)地区居群样本 16 份，其中 8 份来自河池凤山(FS)，8 份来自百色(BS)；桂北(GN)地区居群样本 6 份，均来自桂林(GL)；桂东(GE)地区居群样本 6 份，均来自梧州藤县(TX)，以上提及的地方居群样本均为当地种子苗种植的成年树，种植时间超过 10 年。为避免同一克隆个体的重复采集，在样地调查的基础上，各居群采集相隔距离大于 50 m 的八角单株。其余材料为目前八角嫁接换种时作为接穗的优良种质(GV)，包括 TM、CP、LM、MW、DR、EN、SS、GJ、ME、HY 等种质各 3 份，以及 HZ、BH、HZ-1、RG、FJJ、SJ 等种质各 2 份，共计 42 份。这些种质均来自梧州藤县，并经过人工筛选，是目前较为常用的八角优良接穗种质。以上 95 份材料经广西中医药大学黄荣韶教授鉴定为八角 *Illicium verum*。采集其幼嫩的叶片并记录经纬度，将采集的 95 份种质的嫩叶液氮速冻-80 ℃保存备用。

表 1　53 份八角地方居群样本基本信息

Table 1　Basic informations of 53 *Illicium verum* accessions

样本编号 Sample number	采集地或引种地 Collection or introduction place	分组 Group	经纬度 Longitude and latitude	样本数 Number of samples
QZPB1~7	PB	GS	109° 37′ 98″ E、 22° 18′ 27″ N	7
FCG1~10	FCG	GS	102°28′ 74″ E、 21°68′ 10″ N	10
NNSL1~8	SL	GM	108°60′ 84″ E、 23°43′ 71″ N	8
HCFS1~8	FS	GW	107°03′ 04″ E、 24°53′ 80″ N	8

BS1~8	BS	GW	105°84′84″ E、23°26′72″ N	8
GL1~6	GL	GN	110°28′14″ E、25°07′74″ N	6
WZTX1~6	TX	GE	110°89′59″ E、23°68′22″ N	6

1.2 八角基因组 DNA 的制备

本研究采用 CTAB 法提取 95 份八角的总 DNA。通过电泳检测方法对所提取的八角 DNA 进行质量检测，并使用 NanoDrop 分光光度计对八角 DNA 浓度和纯度进行检测，检测合格后用于后续 SLAF-Seq 建库测序。

1.3 高通量测序

首先选择八角近缘物种鹅掌楸基因组作为参考进行电子酶切预测，确定适用的酶切组合，确保这些组合能够产生在基因组上随机分布且含有较低比例重复序列的片段标记。本研究中，遵循上述规则并采用的内切酶组合为 HaeIII 和 HinCII，利用上述酶切组合处理测序样品的基因组 DNA，构建 SLAF 测序文库，并在 Illumina HiSeq 系统上进行 PE150 测序。

1.4 数据处理和变异检测

为获取有效数据，删除接头污染、低质量 Reads 污染和引物污染的序列。使用 LAST (lastal 759)对高质量 Reads 进行聚类，得到 SLAF 标签，构建“假”参考基因组。参考序列根据相应 SLAF 标记的最大测序深度选择每个位点。将高质量的测序 Reads 利用 bwa 软件比对到参考基因上，利用 GATK 软件进行局部重比对。为确保变异检测结果准确，使用 samtools 和 GATK 进行检测，获取一致性 SNP 位点（完整性> 0.8 和 MAF > 0.05）进行后续分析。

1.5 数据分析

通过数据挖掘和 SNP 检出后，将 SNPs 信息用于遗传进化分析。使用 MEGA X 软件和邻接算法（Kimura 2-parameter 模型，1 000 次 bootstrap 重复）构建系统发育树。基于最大似然法和 K 范围为 1~10，使用 admixture 软件进行群体结构分析，并分析 K 值的交叉验证误差率。使用聚类软件（EIGENSOFT）对 95 份八角材料进行主成分分析（PCA）。遗传多样性分析根据每个居群的 SNP 信息，利用百迈客生物科技有限公司编写好的 perl 脚本进行计算。

2 结果与分析

2.1 酶切方案评估与测序结果

鉴于目前尚无八角的参考基因组，本研究选择了与八角亲缘关系较近的鹅掌楸基因组（Chen et al., 2019）作为参考。根据电子酶切预测，选择了限制性内切酶 HaeIII 和 HinCII，并确定了酶切片段的长度在 364~464 bp，以此作为 SLAF 标签。为了评估测序数据的质量，将 95 个八角个体的测序数据（reads 数量、GC 含量和 Q_{30}）进行了统计。统计结果显示：从 95 份测序样品中共获得 1 588 Mb Reads 数据，测序 Q_{30} 范围在 88.97%~96.62%之间，平均 Q_{30} 为 92.88%，GC 范围在 43.22%~45.61%之间，平均 GC 含量为 44.29%。以上结果表明，本研究获得的测序数据测序质量高，测序结果可靠，满足后续分析需要。

2.2 SLAF 标签与 SNP 统计

通过生物信息学分析，从 95 份八角种质资源中获得了 643 690 个 SLAF 标签（平均测序深度：9.71X），其中有 74 434 个为多态性 SLAF 标签，产生了 2 690 564 个群体 SNP。这些 SNP 的完整度最高为 47.67%，最低为 14.33%，平均完整度为 29.35%；杂合率最高为 7.78%，最低为 2.06%，平均杂合率为 4.46%（表 2）。为研究不同八角种质间遗传关系，基于上述群体 SNP 结果，筛选出了 229 017 个高质量 SNP 标记。

表 2　各样品 SLAF 标签数和 SNP 信息统计

Table 2　Number of SLAF tags and SNP information for each sample

样品编号 Sample number	SLAF标签数 Number of SLAF tags	SNP 数目 Number of SNPs	杂合率 Hetloci ratio (%)	完整度 Integrity ratio (%)	样品编号 Sample number	SLAF 标签数 Number of SLAF tags	SNP 数目 Number of SNPs	杂合率 Hetloci ratio (%)	完整度 Integrity ratio(%)
BH1	302 554	640 084	3.46	23.78	HY1	438 664	781 352	4.31	29.04
BH2	502 680	1 010 608	5.36	37.56	HY2	457 437	945 562	5.56	35.14
BS1	409 335	875 030	5.69	32.52	HY3	422 743	832 408	4.41	30.93
BS2	411 952	796 869	4.37	29.61	HZ-1	487 871	910 990	5.33	33.85
BS3	398 721	804 046	4.07	29.88	HZ-2	360 040	725 212	4.29	26.95
BS4	467 106	819 458	4.70	30.45	HZ1	413 571	882 956	6.29	32.81
BS5	458 665	820 200	4.57	30.48	HZ2	169 915	385 656	2.06	14.33
BS6	464 230	835 721	4.46	31.06	LM1	527 983	1 282 827	7.78	47.67
BS7	387 484	679 219	4.07	25.24	LM2	368 241	620 557	4.18	23.06
BS8	393 758	743 830	3.86	27.64	LM3	411 239	770 165	4.27	28.62
CP1	429 558	804 635	4.34	29.90	ME1	351 811	693 678	3.82	25.78
CP2	385 660	597 981	3.42	22.22	ME2	399 901	718 913	3.91	26.71
CP3	418 570	774 510	4.34	28.78	ME3	423 021	760 346	4.24	28.25
DR1	470 807	882 766	4.94	32.80	MT1	444 929	821 805	4.89	30.54
DR2	449 944	874 496	4.83	32.50	MT2	420 085	816 484	4.63	30.34
DR3	453 248	886 321	5.17	32.94	MT3	419 078	815 544	4.63	30.31
EN1	413 598	746 365	4.09	27.74	MW1	466 242	832 918	4.64	30.95
EN2	412 133	734 540	4.33	27.30	MW2	429 078	779 509	4.21	28.97
EN3	382 251	685 574	4.05	25.48	MW3	443 944	828 371	4.37	30.78

FCG1	482 556	911 374	5.03	33.87
FCG10	448 681	829 818	4.65	30.84
FCG2	507 910	1 201 764	6.12	44.66
FCG3	389 715	881 648	4.75	32.76
FCG4	350 717	802 396	4.63	29.82
FCG5	361 653	815 056	4.61	30.29
FCG6	464 375	859 919	4.53	31.96
FCG7	385 145	766 059	3.92	28.47
FCG8	362 289	742 155	3.77	27.58
FCG9	415 419	744 172	3.96	27.65
FJJ1	215 578	481 572	3.12	17.89
FJJ2	419 350	694 464	4.14	25.81
GJ1	421 331	804 320	4.67	29.89
GJ2	410 663	778 432	4.05	28.93
GJ3	334 710	643 534	3.93	23.91
GL1	447 326	769 710	4.47	28.60
GL2	452 936	792 495	4.53	29.45
GL3	428 710	895 901	4.67	33.29
GL4	359 642	795 362	4.18	29.56
GL5	442 439	869 862	4.56	32.33
GL6	447 033	875 435	5.07	32.53
HCFS1	480 377	873 008	4.76	32.44
HCFS2	477 772	866 283	4.89	32.19

NNSL1	486 154	897 378	5.93	33.35
NNSL2	333 454	723 060	4.01	26.87
NNSL3	340 323	693 014	3.59	25.75
NNSL4	307 266	706 508	4.58	26.25
NNSL5	315 773	654 909	3.68	24.34
NNSL6	416 676	739 352	4.02	27.47
NNSL7	448 765	803 870	4.60	29.87
NNSL8	456 184	804 678	4.44	29.90
QZPB1	190 668	398 235	2.58	14.80
QZPB2	394 119	914 951	5.03	34.00
QZPB3	368 006	802 519	4.29	29.82
QZPB4	306 313	726 979	4.80	27.01
QZPB5	385 512	839 853	4.85	31.21
QZPB6	444 704	816 508	4.41	30.34
QZPB7	479 905	893 951	5.08	33.22
RG1	253 538	552 690	3.46	20.54
RG2	212 334	488 514	3.36	18.15
SJ1	393 050	649 579	3.91	24.14
SJ2	420 667	699 104	4.31	25.98
SS1	451 984	788 152	4.75	29.29
SS2	447 473	775 106	4.66	28.80
SS3	433 594	733 120	4.44	27.24
WZTX1	407 375	797 028	4.57	29.62

HCFS3	370 317	824 500	4.30	30.64	WZTX2	457 963	909 027	4.72	33.78
HCFS4	345 945	738 080	3.64	27.43	WZTX3	429 473	820 831	4.47	30.50
HCFS5	426 815	977 507	5.48	36.33	WZTX4	439 700	801 528	4.31	29.79
HCFS6	400 879	873 154	4.83	32.45	WZTX5	413 506	790 354	4.34	29.37
HCFS7	444 786	815 442	4.26	30.30	WZTX6	388 827	803 364	4.72	29.85
HCFS8	471 495	861 711	4.61	32.02					

2.3 主成分分析与系统发育分析

为明确广西不同地区八角居群样本以及经过人工筛选的优良种质之间的亲缘进化关系，本研究基于筛选出的高度一致性的有效 SNP 变异位点，对 95 份八角种质进行主成分分析(principal pomponent analysis, PCA)和系统发育分析。如图 1 所示，PCA 分析将 95 份八角种质分为 2 簇（I 和 II 簇），PC1 和 PC2 的积累方差贡献率为 8.49%。I 簇中的样本材料为桂北、桂西及部分桂中部地区八角居群样本，分布于主成分坐标轴的右侧，并且这些样本的分布较为聚拢。II 簇中的样本材料为桂南、桂东和部分桂中部地区八角居群样本，以及 42 份经过人工筛选的优良种质，分布于主成分坐标轴的左侧。相比于 I 簇，II 簇的样本在 PCA 分布空间上表现出较为分离的趋势，暗示该类群八角种质来源多样，遗传背景相对于 I 簇来说遗传多样性更高。

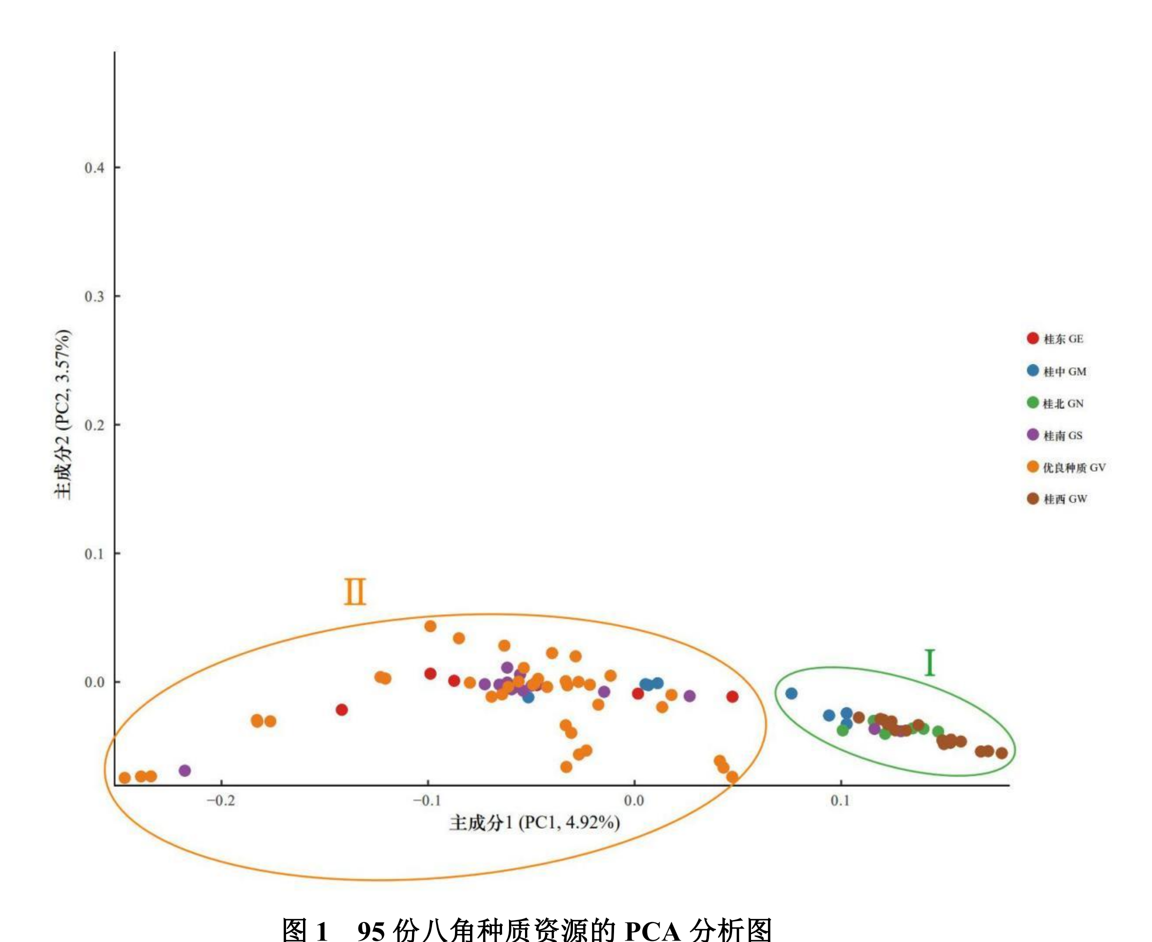


图 1　95 份八角种质资源的 PCA 分析图

Fig. 1　PCA map of 95 *Illicium verum* germplasm resources

与 PCA 分析结果类似，系统发育树分析将 95 份八角种质分成 2 大类群，第 I 类群为来源于桂北、桂西和 3 份桂中部地区的居群样本（NNSL3、NNSL4、NNSL5）；第 II 类群为桂东、桂南和余下的桂中部地区八角居群样本及 42 份经过人工筛选的优良种质材料（图 2）。根据系统发育树结构进一步分析，可以将第 II 大类群样本细分为三个亚类群，其中大部分桂南、桂东、桂中部地区的八角居群样本各自聚为一个亚类群（II-1，II-2，II-3），42 份经过人工筛选的优良种质材料则穿插分布于三个亚类群中。具体而言，有 14 份人工筛选优良种质（HZ1~2，HZ-1~2，EN2~3，SJ1~2，FJJ1~2，RG1~2，BH1~2）与桂南地区八角居群样本聚合为 II-1 亚类群；21 份人工筛选优良种质（LM1~3，ME1~3，HY1~3，CP1、3，GJ1、3，MW1~3，SS1~3，MT1~2）与桂东地区八角居群样本聚为 II-2 亚类群；7 份人工筛选优良种质（CP2、MT3、EN1、GJ2、DR1~3）则与桂中部地区八角居群样本聚为 II-3 亚类群。以上分析结果表明，不同地区八角居群样本的遗传结构在地理分布上具有明显的地域特征；此外，人工筛选的优良种质材料与桂南、桂东和桂中地区的八角居群样本之间的亲缘关系更为接近。

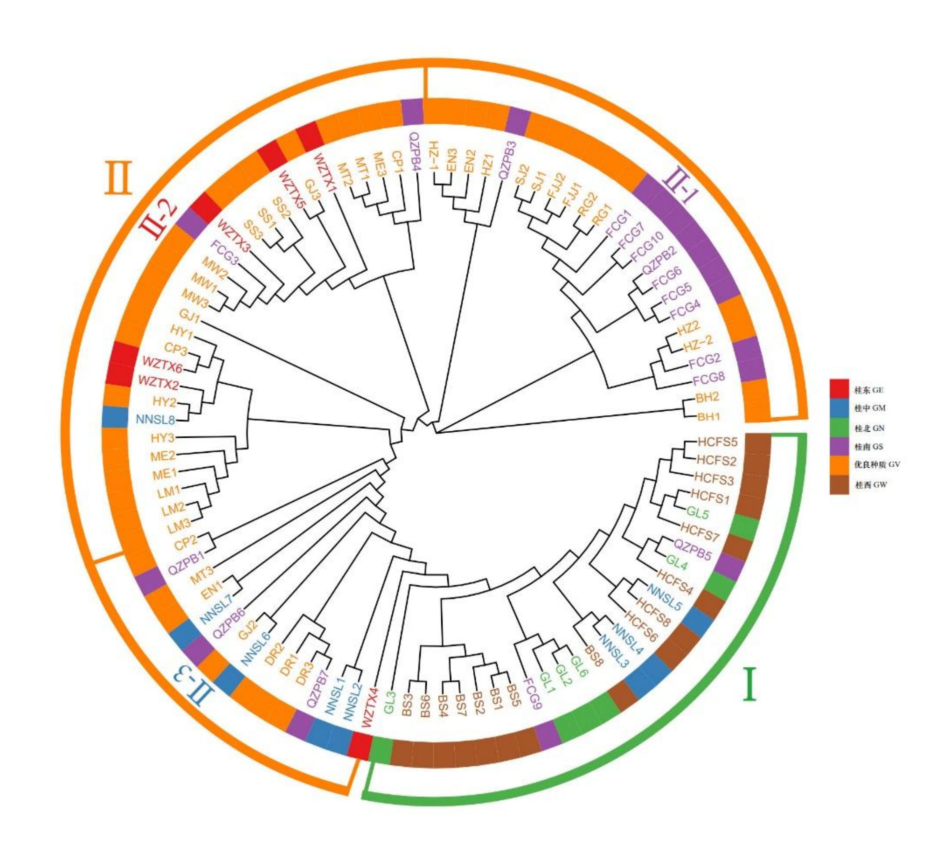


图 2　95 份八角种质资源系统进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree of 95 *Illicium verum* germplasm resources

2.4 群体遗传结构

为了进一步了解广西八角的遗传背景关系，本研究利用上述具有高度一致性 SNP 分子标记，通过 admixture 分析 95 份八角种质的群体遗传结构（图 3）。交叉验证聚类结果表明当 K=2 时，交叉验证错误率与 K=1 时几乎相近，表明这些样本分成 1 个类群或者 2 个类群均是比较合理的。当 K=2 时，95 份八角样本划分成 2 个不同的群体（图 3：A），与 PCA 和系统发育树分类结果高度一致。因此，本文认为 K=2 相比于 K=1 是更为合理的分群方法。基于 K=2 的分组结果（图 3：B），第 I 类群基本为蓝色基因型样本，少部分样本混杂了部分红色基因型；第 II 类群的样本中以红色基因型为主导，其中 II-1、II-2 亚类群中部分人工筛选优良种质有近一半为蓝色基因型，表明这些样本与第 I 类群样本之间存在一定的基因交流。

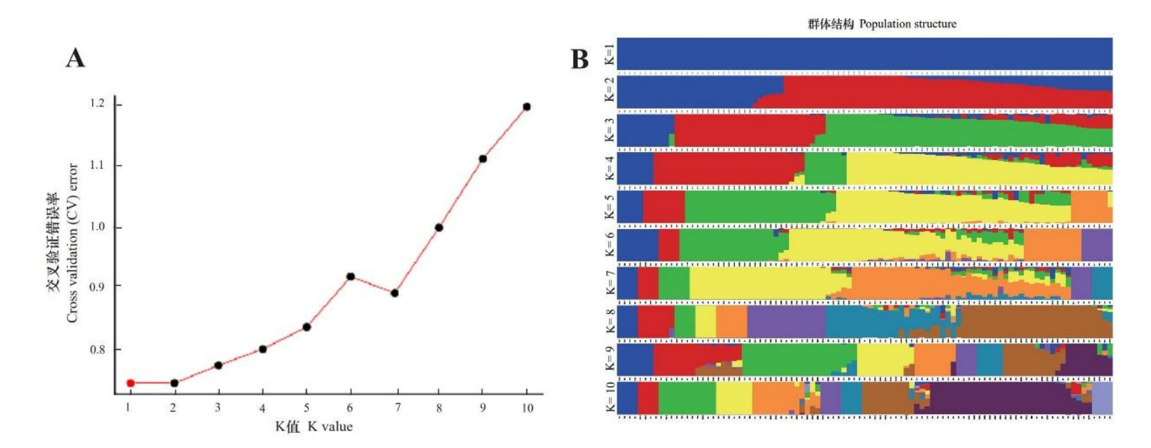


图 3　不同 K 值所对应的交叉验证错误率（A）和交叉各个 K 值对应的个体聚类图（B）

Fig. 3　Admixture validation error rate corresponding to different K values (**A**) and admixture individual cluster values corresponding to each K value (**B**)

2.5 遗传多样性分析

通过分析遗传多样性可以揭示不同地方居群之间的基因流动和遗传变异，有助于解析地理隔离和环境因素对物种遗传结构的影响（吴敏等，2024）。在本研究中，我们对广西 5 个地区八角居群样本及人工筛选的优良种质材料进行了遗传多样性参数的计算（表 3）。研究发现：八角各居群的观测杂合度（H_o）介于 0.130~0.318 之间，平均为 0.231；期望杂合度（H_e）则在 0.262~0.364 之间变动，平均值为 0.320。值得注意的是，所有样本的观测杂合度均低于期望杂合度，暗示着群体内部可能存在自交现象。在居群层面，次要等位基因频率（minor allele frequency，MAF）介于 0.18~0.27 之间，平均值为 0.23；Nei 多样性指数（*H*）在 0.268~0.411 之间，平均值为 0.350；香农维纳指数（*I*）的变动范围为 0.417~0.543，平均值为 0.489。多态性信息含量（polymorphysm information content，PIC）的波动范围为 0.219~0.291，平均值为 0.260，显示所有 6 个居群均展现出中度多态性（PIC 值介于 0.25~至 0.5 之间），暗示群体中存在一定的遗传结构，例如群体内部可能存在亚群结构，或者群体可能受到一些遗传漂变的影响。特别地，桂北地区的八角居群在 MAF、*H*、*I* 和 PIC 上均为最高，其次是桂东、桂中、桂西和桂南地区居群，而人工筛选的优良种质群体的遗传多样性评估值最低。这些结果表明，在 95 份样本中，不同地区八角居群的遗传多样性存在显著差异，其中桂北地区的八角居群表现出最高的遗传多样性，而人工筛选的优良种质群体则显示出最低的遗传多样性。

表 3　八角群体遗传多样性参数

Table 3　Genetic diversity index of *Illicium verum* population

群体编号 Group number	次要等位基因频率 Minor allele frequency（MAF）	期望杂合度 Expected heterozygous number（H_e）	观测杂合度 Observed heterozygous number（H_o）	Nei 多样性指数 Nei diversity index（*H*）	香农维纳指数 Shnnon-Wiener index（*I*）	多态性信息含量 Polymorphysm information content（PIC）
GE	0.27	0.359	0.309	0.411	0.537	0.288
GM	0.25	0.341	0.265	0.381	0.516	0.276
GN	0.27	0.364	0.318	0.417	0.543	0.291
GS	0.19	0.281	0.170	0.295	0.442	0.233

GV	0.18	0.262	0.130	0.268	0.417	0.219
GW	0.22	0.310	0.195	0.326	0.476	0.252
平均 Average	0.23	0.320	0.231	0.350	0.489	0.260

3 讨论与结论

3.1 SLAF-Seq 在遗传多样性分析上的优势

广西八角种植历史悠久，其种质资源丰富且表型多样，这些表型差异表现在外观性状和内在品质等方面(潘晓芳等，2007)。表型多样性是遗传多样性与环境适应相互作用的产物，它既具有稳定性，也展现出一定的变异性（Li et al., 2018）。尽管基于表型的分类方法具有直观性，但该方法的主要局限性在于，它难以剔除环境因素对生物形态特征的影响。例如，八角花中的花青素含量受到光照、温度等多种环境因素的影响，这些因素显著地调节着其颜色的表现（曾祥艳等，2024）。因此，揭示广西八角不同种质资源的遗传多样性，对于八角种质资源的分类、优良种质筛选、开发与保护具有重要理论指导意义。与传统的分子标记技术相比，SLAF-Seq 技术能够提供更多的遗传标记且不受参考基因组的限制，可用于药用植物种质资源评价鉴定、遗传图谱构建、亲缘关系分析等研究（崔学强等，2023）。本研究利用 SLAF-Seq 技术对来源于广西的 5 个地区 53 份八角居群样本和 42 份经过人工筛选的优良种质进行高通量测序，标签的平均测序深度为 9.71X，测序平均 Q_{30} 为 92.88%。研究中共得到 1 588 Mb reads，获得 SLAF 标签 643 690 个，其中多态性 SLAF 标签 74 434 个。群体 SNP 2 690 564 个，获得高度一致性 SNP 位点 229 017 个。因此，基于本研究获得的高通量 SNP 对 95 份八角样本进行遗传多样性分析，相比于前人的研究将会大幅度提高分析结果的分辨率与准确度。

3.2 广西八角的遗传结构分析

种质资源是开展遗传育种工作的基础，群体遗传学分析可以帮助我们了解物种内部的遗传多样性和遗传结构，从而指导种质资源的保护和利用，并为优良种质选育和遗传改良提供重要的信息（闫平玉等，2024）。在本研究中，PCA 分析、系统发育分析和群体结构分析结果一致表明，广西不同地区的八角居群样本可以分为两个类群，这两个类群有较为明显的地域差异特征。地理分布是影响种群的遗传结构的一个重要因素（李旭民等，2022），在本研究中，桂西、桂北居群样本与桂东、桂南居群样本分别聚为两大类群，暗示着可能是由于引种地区环境、气候差异较大条件下，八角在长期适应过程中逐渐产生了可遗传的地理变异，最终分化为两大类群，使得广西八角遗传结构具备明显的区域特征（黄卓民，1994）。桂中部地区八角种质在两大类群中均有分布，推测可能是由于南宁作为环北部湾沿岸重要的经济中心和交通枢纽，给该地区八角引种栽培带来了极大的便利，增加了其基因流动性。此外，本研究收集的八角优良种质的遗传背景更接近于桂南、桂东地区八角居群，表明目前市场上主要流通的各种八角优良种质主要从桂南、桂东地区八角种植产地筛选而来。

3.3 广西八角的遗传多样性分析

本研究中我们还评估了不同地方居群样本以及人工筛选的优良种质的群体遗传多样性，研究结果显示桂北地区八角群体的遗传多样性最高，而桂南地方居群样本的遗传多样性最低。究其原因，首先桂北地区并非八角的适宜种植地区，较高的遗传多样性有助于植物种群适应生态环境的变化；其次该地区八角种植引种时间相对较短，导致该地区的八角基本没有经历过人工选择；此外，地理隔离的因素也可能是导致桂北地区八角遗传多样性高的原因之一（黄卓民，1994）。相比之下，其他地区尤其是桂南地区（防城港）的八角种植历史相对悠久，

且可能经历过较长时间的人工选择过程，因此可能会导致遗传多样性有所降低。人工筛选的优良种质的遗传多样性均低于各地区居群样本，进一步佐证了以上推测。此外，期望杂合度是衡量种群遗传多样性的关键指标。在本研究中，所有八角群体样本的观测杂合度低于期望杂合度，这一现象可能由几个因素引起：（1）基因流可能带来外来基因，从而影响原有的遗传多样性；（2）近亲繁殖可能增加纯合子频率，减少杂合子频率；（3）自然选择可能倾向于某些等位基因，增加特定纯合基因型的比例。结合广西八角的实际情况，我们认为近亲繁殖（自交）可能是导致观测杂合度低于期望值的主要因素，这与陈昌婕等（2024）对蕲艾遗传多样性的研究结果相类似。此外，王乙淋等（2023）关于广西八角居群间基因交流频繁的研究结果也支持了这一观点。

综上所述，本研究利用 SLAF-Seq 技术详细分析了广西不同地方居群样本以及经过人工筛选的优质种质间的遗传结构和遗传多样性，对这些经过人工筛选的八角优良种质遗传背景的认定及科学系统的划分提供了理论参考，为推进广西八角品种的鉴定、种质分类和分子辅助育种工作的开展提供科学的研究基础。

参考文献：

CHEN CJ, XIAO C, MA YY, et al., 2024. Genotyping-by-sequencing reveals genetic diversity of *Aartemisia argyi* germplasm resources [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 30(18): 171-177. [陈昌婕，肖闯，马钰洋，等，2024. 基于 GBS 简化基因组技术的蕲艾遗传多样性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志，30(18)：171-177.]

CHEN JH, HAO ZD, GUANG XM, et al., 2019. Liriodendron genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation [J]. Nature plants, 5(1): 18-25.

Chinese Pharmacopoeia Commission, 2020. Chinese Pharmacopoeia: 2020 ed. Part 1 [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press: 5. [国家药典委员会，2020. 中华人民共和国药典：2020 年版. 一部 [M]. 北京：中国医药科技出版社：5.]

CUI XQ, DENG JL, HUANG CY, et al., 2023. SNP molecular markers development and population genetic diversity analysis of *Liparis gigantea* [J]. Northern Horticulture, 47(21): 101-108. [崔学强，邓杰玲，黄昌艳，等，2023. 紫花羊耳蒜 SNP 标记开发及居群遗传多样性分析 [J]. 北方园艺，47(21)：101-108.]

CUI XQ, HUANG CY, DENG JL, et al., 2023. SNP markers development and genetic relationship analysis of *Dendrobium Germplasms* using SLAF-seq technology [J]. Biotechnology Bulletin, 39(6): 141-148. [崔学强，黄昌艳，邓杰玲，等，2023. 基于 SLAF-seq 技术的石斛兰 SNP 标记开发及亲缘关系分析 [J]. 生物技术通报，39(6)：141-148.]

DAI XX, JIANG LG, 2019. Research on the present situation and development strategy of Star Anise industry in Gulong Town Teng County of Guangxi [J]. Forestry World, 8(3): 79-85. [戴晓萧，江立庚，2019. 广西藤县古龙镇八角产业现状及发展对策研究 [J]. 林业世界，8(3)：79-85.]

Editorial Committee of China Flora of Chinese Academy of Sciences, 2004. Flora Republicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Science Press: 228. [中国科学院中国植物志编辑委员会，2004. 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社：228.]

HE ZJ, HUAN J, YE M, et al., 2024. Based on cites pace insights into *Illicium verum* Hook. f. current hotspots and emerging trends and China resources distribution [J]. Foods (Basel, Switzerland), 13(10): 1510.

HUANG ZM, 1994. *Illicium verum* [M]. Beijing: China Forestry Press: 12-47. [黄卓民，1994. 八角 [M]. 北京：中国林业出版社：12-47.]

LIAO WJ, LUO J, ZOU DX, et al., 2023. First report of anthracnose caused by Colletotrichum siamense on *Illicium verum* in China [J]. Plant Disease, 107(7): 2232.

LI W, WU ZG, XIA YP, et al., 2022. Antiviral and antioxidant components from the fruits of *Illicium verum* Hook.f. (Chinese Star Anise) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70(12): 3697-3707.

LI XM, YAN YJ, XU B, et al., 2022. Evolutionary relationships of 7 populations of *Triosteum himalayanum* based on SNP sites by genotyping-by-sequencing [J/OL]. Molecular Plant Breeding: 1-18. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221026.1732.002.html. [李旭民，严雨杰，徐斌，等，2022. 基于简化基因组 SNP 位点的穿心莛子藨 7 个居群进化关系 [J/OL]. 分子植物育种：1-18. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221026.1732.002.html.]

LI YG, LIU XH, MA JW, et al., 2018. Phenotypic variation in Phoebe bournei populations preserved in the primary distribution area [J]. Journal of Forestry Research, 29(1): 35-44.

LIU D, MENG JJ, WANG P, et al., 2024. SLAF-seq molecular markers in different ecological types of *Isatis tinctoria* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 55(7): 2375-2382. [刘东，孟瑾瑾，王盼，等，2024. 不同生态类型菘蓝 SLAF-seq 分子标记 [J]. 中草药，55(7)：2375-2382.]

LU HY, MO YT, ZHENG SX, et al., 2024. Effects of light and nitrogen interactions on growths and physiological characteristics of *Illicium verum* seedlings [J]. Guangxi Forestry Science, 2024, 53(2): 152-159. [陆华业，莫艺莛，郑绍鑫，等，2024. 光氮互作对八角幼苗生长和生理特性的影响 [J]. 广西林业科学，53(2)：152-159.]

PAN XF, MA JL, XIE WD, 2007. Genetic diversity and improved varieties selecting and breeding in Star anise [J]. Non-wood Forest Research, 25(2): 45-47.[潘晓芳，马锦林，谢伟东，2007. 八角的遗传多样性与良种选育 [J]. 经济林研究，25(2)：45-47.]

PATRA JK, DAS G, BOSE S, et al., 2020. Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance [J]. Phytotherapy Research: PTR, 34(6): 1248-1267.

SHARAFAN M, JAFERNIK K, EKIERT H, et al., 2022. *Illicium verum* (Star Anise) and trans-anethole as valuable raw materials for medicinal and cosmetic applications [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 27(3): 650.

SHEN T, YU H, WANG YZ, 2023. Population genetic diversity and genetic structure of *Gentiana rigescens* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 54(3): 926-938. [沈涛，虞泓，王元忠，2023. 滇龙胆居群遗传多样性和遗传结构分析 [J]. 中草药，54(3)：926-938.]

SUN XY, PAN XF, BI DL, et al., 2011. A research progress of the classification system and genetic relationship of Illiciaceae [J]. Guangxi Forestry Science, 40(1): 48-50. [孙雪阳，潘晓芳，闭冬玲，等，2011. 八角科分类系统和亲缘关系研究进展 [J]. 广西林业科学，40(1)：48-50.]

WANG GW, HU WT, HUANG BK, et al., 2011. *Illicium verum*: a review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 136(1): 10-20.

WANG YL, LI JX, MO MZ, et al., 2023. Phylogeography of *Illicium verum* from different populations in Guangxi based on ITS2 and psbA-trnH [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 46(2): 320-325. [王乙淋，黎金信，莫明子，等，2023. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列的广西不同居群的八角谱系地理学 [J]. 中药材，46(2)：320-325.]

WU M, WU SQ, PAN F, et al., 2024. Genetic diversity and genetic structure of wild *Pinellia*

ternata (Araceae) in China [J]. Guihaia, 44(4): 766-776. [吴敏，吴诗琪，潘凤，等，2024. 中国野生半夏的遗传多样性和遗传结构研究 [J]. 广西植物，44(4)：766-776.]

YAN PY, ZHANG L, WANG JX, et al., 2024. Analysis of genetic diversity and construction of core collections of Korean pine (*Pinus koraiensis*) natural population [J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition), 48(5): 69-80. [闫平玉，张磊，王佳兴，等，2024. 红松天然种群遗传多样性分析及核心种质构建 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版)，48(5)：69-80.]

YU XH, YANG YM, LI YX, et al., 2022. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Illicium verum* [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 35(6): 1261-1268.[余兴华，杨艳梅，李玉祥，等，2022. 基于八角转录组序列的 SSR 分子标记引物开发 [J]. 西南农业学，35(6)：1261-1268.]

ZENG LP, ZHANG N, MA H, 2014. Advances and challenges in resolving the angiosperm phylogeny [J]. Biodiversity Science, 22(1): 21-39. [曾丽萍，张宁，马红，2014. 被子植物系统发育深层关系研究：进展与挑战 [J]. 生物多样性，22(1)：21-39.]

ZENG XY, YANG ZY, WANG K, et al., 2024. Analysis on varieties and superior tree economic characters of *Illicium verum* from four regions in Guangxi [J/OL]. Guihaia: 1-12. [曾祥艳，杨卓颖，王坤，等，2024. 广西四个产地八角品种类型及优树主要经济性状分析 [J/OL]. 广西植物：1-12.]

ZHAO YQ, FAN CZ, ZHANG JZ, et al., 2021. SNP loci development and genetic structure of cultivated and wild individuals of *Humulus lupulus* using SLAF-seq [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 52(20): 6365-6372. [赵亚琴，樊丛照，张际昭，等，2021. 基于简化基因组技术的啤酒花栽培种和野生种 SNP 位点开发及遗传结构分析 [J]. 中草药，52(20)：6365-6372.]

ZOU QY, HUANG YY, ZHANG WY, et al., 2023. A comprehensive review of the pharmacology, chemistry, traditional uses and quality control of Star Anise (*Illicium verum* Hook. F.): An aromatic medicinal plant [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 28(21): 7378.